

Wolne rodniki tlenowe a nadciśnienie tętnicze

Oxygen Free Radicals and Arterial Hypertension

Summary

An oxidative stress is a result of an imbalance between pro- and antioxidants, and leads to several alterations on subcellular level, and therefore may be involved in aging and numerous pathological disorders. The aim of this review of literature was to present current knowledge on contribution of free radicals in pathogenesis of essential hypertension.

The sources of free radicals in vascular system are NADH/NAD(P)H oxidases, xanthine oxidase, nitric oxide synthase, cyclooxygenase of endothelial cells, vascular myocytes, macrophages and neutrophils. Free radicals cause destruction of cell membranes, intracellular Ca^{2+} overload, genome impairment, and deficit of energy. The reduced activity of nitric oxide found in arterial hypertension may be a result of either decreased synthesis or increased inactivation by superoxide anions, and contributes to endothelial dysfunction. Low activity of nitric oxide results in domination of vasoconstrictive activity such factors as angiotensin II, endothelin, prostaglandin H_2 and thromboxane A_2 . Moreover, the deficit in nitric oxide seems to be partially responsible for deterioration of natriuresis.

Recently, it has been revealed that free radicals are mediators of angiotensin's as well as endothelin and bradykinin action. They act also as mediators of growth factors, through activation of protooncogenes c-fos and c-jun, and therefore may contribute to hypertensive arterial wall remodeling. Some studies have demonstrated presence of positive relationship between blood pressure values and activity of enzyme, which are responsible for release of free radicals, or concentration of free radicals.

Finally, the possibility of preventing vasoconstriction and arterial wall remodeling by antioxidants confirms partial contribution of free radicals in promoting vascular alterations.

Although published studies don't allow to consider free radicals as an proved reason of arterial hypertension, they evidence the contribution of free radicals in development of hypertension complications.

key words: hypertension, oxygen free radicals, nitric oxide, angiotensin II, endothelin


Arterial Hypertension 2001, vol. 5, no 2, pages 147–158.

Wolne rodniki tlenowe (OFR — *oxygen free radicals*) pełnią w ustroju dwojaką rolę. Choć z reguły postrzegane są jako uboczne produkty metabolizmu uszkodzające struktury subkomórkowe, to stymulują również różnicowanie i wzrost komórek, uwalnianie przez granulocyty wielojądrzaste są narzędziem obrony przeciwbakteryjnej, pełnią funkcję przekazników sygnałów lub mediatorów przekazywania komórkowego, a także modulują ekspresję genów i są mediatorami transkrypcji genowej (np. genów odpowiedzialnych za syntezę białka chemotaksji monocytów — MCP-1 lub białka adhezyjnego VCAM-1 — *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, istotnych w rozwoju miażdżycy) [1, 2].

Organizm narażony jest stale na działanie OFR, gdyż jednym z podstawowych źródeł ich powstawania jest metabolizm komórkowy i działanie enzymów. Brak równowagi między czynnikami prooksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi może być przyczyną upośledzonej neutralizacji OFR i ujawnienia ich niekorzystnego działania.

Badania intensywności wytwarzania OFR w różnych sytuacjach klinicznych oraz ich wpływu na komórki i ich struktury pozwoliły na patogenetyczne powiązanie stresu oksydacyjnego z procesem starzenia oraz z wieloma jednostkami chorobowymi. Wolnorodnikowa teoria starzenia tłumaczy degeneracyjne zmiany starcze uszkodzającym wpływem wolnych rodników tlenowych. W badaniach własnych przeprowadzonych w grupie 93 osób w wieku 21–102 lat potwierdzono cechy stresu oksydacyjnego u osób starszych w postaci

Adres do korespondencji: dr med. Anna Skalska
Katedra Gerontologii i Medycyny Rodzinnej CMUJ
ul. Wielicka 267, 30–663 Kraków
tel. (012) 658–50–20, faks: (012) 658–77–41

 Copyright © 2001 Via Medica, ISSN 1428–5851

słabszej niż u osób młodych aktywności enzymów antyoksydacyjnych — dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) [3]. Do chorób, w których wykazano istnienie zaburzeń równowagi oksydacyjnej ustroju, zalicza się np. miażdżycę, zaćmę, nowotwory, chorobę Parkinsona, chorobę Alzheimera, wstrząs septyczny, reperfuzyjne uszkodzenia tkanek, naczyniowe powikłania cukrzycy, uszkodzenia chrząstki stawowej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów [4–8]. Nie zawsze jednak, przy obecnym stanie wiedzy, można udowodnić związek przyczynowy między stresem oksydacyjnym a chorobą, tak jak to wykazano w przypadku miażdżycy [4]. Częściej współistnienie stanu chorobowego i stresu oksydacyjnego budzi wątpliwość, czy chorobę spowodowały zaburzenia równowagi oksydacyjnej ustroju, czy jest to tylko koincydencja zjawisk, czy też stres oksydacyjny jest następstwem choroby.

Jak w wielu innych schorzeniach, również w nadciśnieniu tętniczym wykazano cechy zaburzonej równowagi oksydacyjnej — zwiększonym stężeniom rodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i nadtlenu wodoru (H_2O_2) [9–14] towarzyszą obniżone stężenia antyoksydantów: witaminy E i glutationu (GSH), oraz zmniejszona aktywność SOD [10, 11, 15]. Uznany wskaźnikiem stresu oksydacyjnego jest wzrost stężenia formy utlenionej glutationu (GSSG); u pacjentów z nadciśnieniem stosunek formy utlenionej glutationu do zredukowanej (GSSG/GSH) może być nawet dwukrotnie wyższy niż u osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego krwi [16].

Celem dokonanego przeglądu piśmiennictwa jest próba podsumowania dotychczasowej wiedzy na temat udziału OFR w patogenezie nadciśnienia tętniczego.

Potencjalne źródła OFR w układzie naczyniowym

W obrębie naczyń krwionośnych OFR mogą być uwalniane przez komórki śródbłonna, miocyty, fibroblasty, makrofagi lub zaktywowane granulocyty obojętnochłonne [9, 16–20].

Głównym źródłem OFR w naczyniach są oksydazy: oksydazy NADH/NADPH wykorzystujące dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) lub fosforan dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) jako substraty przenoszące elektrony [9, 17, 18, 20, 21] oraz oksydaza ksantynowa, obficie występująca w komórkach śródbłonna, obecna także w osoczu [9]. Oksydaza NADH zlokalizowana jest w błonie komórkowej śródbłonna i miocytów. Pobudzona przez angiotensynę II (nawet w stężeniu fizjologicznym) [17, 20] lub przez pulsacyjny wzrost na-

pięcia ściany naczyniowej [22] uwalnia $O_2^{\cdot-}$ w sposób ciągły, w odróżnieniu od oksydazy NADPH komórek fagocytarnych: makrofagów i granulocytów wielojądrzastych, które po aktywacji zwiększają zużycie tlenu, co nazywane jest „wybuchem oddechowym”, oraz uwalniają duże ilości rodnika ponadtlenkowego [1, 21]. Czynniki stymulującymi „wybuch oddechowy” są poza bakteriami np. wielonienasycone kwasy tłuszczowe, leukotrien B_4 , czynnik martwicy nowotworów — TNF (*tumor necrosis factor*), czynnik aktywujący płytki — PAF (*platelets activating factor*), płytkowy czynnik wzrostu — PDGF (*platelet derived growth factor*), kompleksy antygen-przeciwciała.

W wyniku zmniejszonej, zależnej od selektywności, adhezji do komórek śródbłonna, zarówno liczba krążących leukocytów i granulocytów [16, 23, 24], jak i aktywność błonowej oksydazy NADPH neutrofilów [10, 11] są wyższe u osób z nadciśnieniem tętniczym niż u osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia. Z kolei aktywne granulocyty wielojądrzaste u osób z nadciśnieniem uwalniają istotnie więcej $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 w porównaniu z granulocytami osób zdrowych [11, 12, 16]. W badaniach Sagara i wsp. stężenie uwalnianych przez neutrofile OFR korelowało liniowo z wysokością skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi [11].

Oksydaza ksantynowa katalizuje reakcję utleniania hipoksantyny do ksantyny i kwasu moczowego, której towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do $O_2^{\cdot-}$ lub H_2O_2 .

Aktywność oksydazy ksantynowej i stężenie powstającego w wyniku jej działania kwasu moczowego są podwyższone u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i korelują z wysokością ciśnienia [25, 26]. Zastosowanie związków blokujących oksydazę ksantynową lub oksydazę NAD(P)H powoduje zmniejszenie stężenia OFR [17], szczególnie przy współistniejącej hipercholesterolemii [27].

Eksperymenty *in vitro* udowodniły, że źródłem $O_2^{\cdot-}$ może być również śródbłonkowa syntaza tlenu azotu — NOS III. Zarówno usunięcie śródbłonna [28], jak i działanie antagonisty NO — nitro L-argininy — powodują spadek ilości tlenu azotu (NO) i zmniejszają produkcję wolnych rodników tlenowych [29]. Zatem NOS III wytwarza zarówno NO, jak i $O_2^{\cdot-}$, a regulatorem stosunku ich uwalniania jest kofaktor NOS III — tetrahydrobiopteryna BH_4 . Jej suplementacja zwiększa syntezę NO [30], a niedobór, obserwowany np. w hipercholesterolemii, sprzyja zwiększonej produkcji $O_2^{\cdot-}$ [31] z jednoczesnym mniejszym uwalnianiem NO. Ponieważ biopteryna służy jako kofaktor NOS III tylko w całkowicie zredukowanej formie jako BH_4 [32], a hipercholesterolemia wiąże się ze zwiększonym stężeniem silnie utleniających OFR, dostępność formy zredukowanej może być

ograniczona. Ting i wsp. obserwowali równoległą poprawę śródbłonkowo-zależnej wazorelaksacji i poprawę biodostępności BH₄ po podaniu antyoksydacyjnej witaminy C u osób z hipercholesterolemią [33]. Sugeruje się również kooperację BH₄ i L-argininy, której efektem jest wzajemne zwiększenie powinowactwa do miejsc wiążących NOS III. Stąd ograniczona biodostępność BH₄ może prowadzić do względnego niedoboru L-argininy [27].

Wolne rodniki tlenowe uwalniane są również w szlaku cyklooksygenazy. Efektem zablokowania enzymu jest zwiększenie reakcji rozkurczowej naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę (ACh) [34]. Ponieważ ani podanie L-argininy, ani jej analogu — L-N^G-monometyloargininy (L-NMMA) nie zmienia reakcji naczyń na ACh, sugeruje się, że zablokowanie syntezy prostanoidów zwiększa dostępność NO [35, 36]. Z kolei u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym podanie indometacyny znosi korzystny efekt witaminy C na poprawę funkcji rozkurczowej śródbłonka, co pozwala przypuszczać, że jednym z czynników wazokonstrykcyjnych uwalnianych w szlaku cyklooksygenazy jest O₂, przyczyniający się do wystąpienia stresu oksydacyjnego i unieczynniania NO [37].

Zatem śródbłonek naczyniowy, w swoim strategicznym położeniu między krążącą krwią a mięśniątkiem ścianki naczyń, jest stale narażony na uszkodzające działanie reaktywnych form tlenu, których istotnymi źródłami w obrębie naczyń są oksydazy NADH komórek śródbłonka i miocytów, oksydazy NADPH fagocytów, oksydaza ksantynowa, śródbłonkowa syntaza NO i szlak cyklooksygenazy.

Wolnorodnikowe uszkodzenia komórek

Wolne rodniki, będące bardzo aktywnymi utleniaczami, powodują peroksydację lipidów błon komórkowych i organelli wewnątrzkomórkowych, obfitujących w podatne na utlenianie kwasy wielonienasycone, a także utleniają białka strukturalne i enzymatyczne. Następstwem tych kaskadowo przebiegających reakcji jest zarówno uwolnienie kolejnych wolnych rodników, jak i dysfunkcja komórek w wyniku uszkodzenia błon, inaktywacji enzymów, przeciążenia komórek jonami wapnia, niedoborów energetycznych i uszkodzenia materiału genetycznego komórek [1, 2].

Nadciśnienie tętnicze w większości przypadków związane jest ze wzrostem oporu obwodowego, regulowanego funkcją sympatycznego układu nerwowego, wpływem hormonów oraz para- i autokrynnym działaniem związków wazoaktywnych w obrębie ścian naczyń. Istotną kontrolę napięcia naczyniowego pełni śródbłonek.

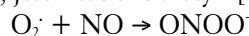
Wolne rodniki jako przyczyna dysfunkcji śródbłonka

Śródbłonek naczyniowy syntetyzuje i wydziela wiele substancji, takich jak tlenek azotu (NO), prostacyklina (PGI₂), śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący, peptyd natriuretyczny typu C, endotelina (ET₁), prostaglandyna H₂ (PGH₂) i tromboksan A (TXA₂) [38]. Zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami kurczącymi a rozszerzającymi naczynia może prowadzić do wzrostu oporu obwodowego i wywoływać nadciśnienie tętnicze. Rezultaty wielu badań wskazują na związek między zwiększoną produkcją OFR a wzmożonym napięciem naczyń [39–41] oraz na udział OFR w wywoływaniu dysfunkcji śródbłonka [42].

Obserwowana u chorych z nadciśnieniem tętniczym zmniejszona biodostępność NO [13, 14, 43, 44] może być skutkiem:

- zmniejszonej jego syntezy w wyniku uszkodzenia komórek śródbłonka, na przykład przez OFR [27];
- działania wytwarzanego przez endotelium i krążącego w osoczu endogennego inhibitora syntezy NO — asymetrycznej dwumetyloargininy (ADMA), której stężenie dodatnio koreluje z wiekiem, wartością średniego ciśnienia tętniczego i stężeniem glukozy [32, 45];
- unieczynniania NO przez uwalniany w nadmiarze O₂.

Ta ostatnia możliwość uważana jest za najważniejszą przyczynę zmniejszonej dostępności NO [13]. Produktem reakcji, która przebiega trzykrotnie szybciej niż reakcja dysmutacji O₂^{•−} katalizowana przez SOD i 10 000 razy szybciej niż neutralizacja rodnika ponadtlenkowego przez witaminę A, E lub C, jest nadtlenoazotyn [1]:



Jest on o wiele słabszym (niż NO) czynnikiem naczyniorozkurczającym, natomiast silniejszym i bardziej stabilnym (niż O₂^{•−} i H₂O₂) utleniaczem. Utlenia on grupy tiolowe białek, inicjuje peroksydację lipidów, hamuje mitochondrialny łańcuch oddechowy, zwiększa napływ jonów wapnia do komórki, a w fizjologicznym pH może zostać uprotonowany do kwasu nadtlenoazotowego [13, 46] (ONOO[•] + H⁺ → ONOOH), który z kolei rozpada się, stając się źródłem nadzwyczaj reaktywnych form tlenu — rodnika wodorotlenowego (OH[•]), dwutlenku azotu (NO₂[•]), kationu nitroniowego (NO₂⁺) i jonu wodorotlenowego OH[−] [13]. Pierwsze trzy związki mogą być przyczyną poważnego uszkodzenia komórek śródbłonka [13].

Tlenek azotu wywiera działanie rozkurczające naczynia, antyagregacyjne, hamuje proliferację miocytów naczyniowych, a wobec jego niedoboru prze-

wagę zyskują śródbłonkowe czynniki wazokonstrykcyjne i proagregacyjne wytwarzane w szlaku cyklo-oksigenazy: TXA_2 i PGH_2 [47] oraz endotelina. Endotelina, poza obkurczaniem naczyń, stymuluje proliferację miocytów, przyspiesza syntezę białek adhezyjnych i chemotaktycznych powodując chemotaksję i adhezję monocytów [27, 47].

O istotnej roli NO w regulacji napięcia naczyniowego świadczy fakt, że zahamowanie syntezy innego silnego czynnika wazodylatacyjnego — PGI_2 (przez inhibitory cyklooksigenazy), w większości naczyń nie zmienia napięcia i nie upośledza perfuzji [47]. Sugeruje się, że stałe, podstawowe uwalnianie NO utrzymuje naczynia w stanie rozkurczu (czego nie obserwuje się pod wpływem prostacykliny), a jego niedobór może przyczynić się do wzrostu oporu obwodowego i rozwoju nadciśnienia tętniczego [47].

W badaniach eksperymentalnych oraz *in vivo* skutkiem hamowania syntazy NO przez analogi argininy: L-NMMA (L- N^G -monometyloargininę) lub L-NAME (metyloester L-nitroargininy) jest śródbłonkowo-zależna wazokonstrykcja i istotny wzrost ciśnienia tętniczego [48–52], a dłuższe stosowanie L-NAME wywołuje trwale nadciśnienie tętnicze [52, 53]. Stężenie metabolitów NO (azotanów i azotynów) ujemnie koreluje z wartością SBP i DBP [44].

Udział rodnika ponadtlenkowego w wywoływaniu dysfunkcji śródbłonka potwierdza korzystny wpływ SOD lub infuzji antyoksydacyjnych witamin, które podawane w stanach stresu oksydacyjnego związanego z miażdżycą, nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, paleniem tytoniu, hipercholesterolemią czy starzeniem, powodowały istotną poprawę śródbłonkovoależnej wazorelaksacji [1, 37, 54–57]. Brovkovich i wsp. wykazali, że komórki śródbłonka szczurów z nadciśnieniem (SHR — *spontaneously hypertensive rats*) lub znajdujące się pod wpływem natywnych i utlenionych cząstek cholesterolu frakcji LDL, (a więc w sytuacjach, w których obserwuje się upośledzoną funkcję rozkurczową śródbłonka) uwalniają istotnie więcej O_2 , przy jednocześnie stwierdzanych niższych stężeniach NO, w porównaniu z ilościami syntetyzowanymi przez śródbłonek szczurów bez nadciśnienia tętniczego (WKY) [13]. Ci sami autorzy obserwowali pod wpływem SOD wzrost stężenia NO uwalnianego przez śródbłonek szczurów SHR o 80%, podczas gdy u szczurów WKY tylko o 10% [13].

Choć korzystny wpływ SOD wydaje się paradoksalny, gdyż produktem jej działania jest H_2O_2 (również reaktywna forma tlenu), to jednak zapobiega ona reakcji O_2 i NO i wytworzeniu ONOO $^-$, który jest znacznie silniejszym utleniaczem niż nadtlenek wodoru.

Zmniejszonej biodostępności NO, obserwowanej zarówno w naczyniach przewodzących, jak i oporowych, towarzyszy działanie czynników wazokonstrykcyjnych, czego skutkiem może być rozwój nadciśnienia tętniczego.

Sam rodnik ponadtlenkowy wywołuje również wazokonstrykcję [14, 58].

Wpływ OFR na obkurczenie naczyń i wzrost oporu obwodowego obserwowano również (przynajmniej u szczurów) na drodze zwiększenia pod ich wpływem uwalniania TXA_2 przez miocyty ściany naczyniowej [59].

Zatem skutkiem działania OFR jest bezpośrednie uszkodzenie komórek śródbłonka i działanie wazokonstrykcyjne oraz unieczynnienie NO, co nie tylko upośledza rozkurcz naczyń, podwyższa jego napięcie, ale daje też przewagę mediatorom obkurczającym naczynia, stymulującym proliferację miocytów i adhezję komórek fagocytarnych.

Tlenek azotu a sódowrażliwość

Zmienność ciśnienia tętniczego pod wpływem dostarczanego do organizmu sodu określana jest sódowrażliwością i świadczy o zaburzeniu natriurezy ciśnieniowej, decydującej o sprawności nerkowych mechanizmów wydalania sodu. Natriureza ciśnieniowa uczestnicząca w regulacji czynności nerek i ciśnienia tętniczego jest warunkowana równowagą wewnątrznerkowego wytwarzania rozszerzających naczyń i zwiększających natriurezę NO i PGE_2 , a działającej naczyniozężłająco i sprzyjającej retencji sodu angiotensyny II.

Wyniki badań eksperymentalnych pozwalają przypuszczać, że niedobór NO sprzyja występowaniu nadciśnienia sódowrażliwego [60]. U sódowrażliwych szczurów Dhal/Rapp stwierdzono obecność mutacji genu syntazy NO. Podanie im L-argininy zwiększa stężenie NO, obniża ciśnienie tętnicze, normalizuje ciśnieniową natriurezę i koryguje sódowrażliwość [61, 62]. Z kolei zahamowanie syntezy NO u szczurów sodoopornych oraz w rdzeniu nerek otyłych szczurów Zucker wywołuje sódowrażliwość i wzrost ciśnienia [63–65]. Te dowody, choć uzyskane w badaniach nad zwierzętami, sugerują, że sódowrażliwość może być częściowo związana z niedoborem NO. U osób z nadciśnieniem sódowrażliwym podstawowa synteza NO nie jest zmniejszona, ale zastosowanie ograniczenia spożycia sodu powoduje dwukrotne zwiększenie wydalania metabolitów NO (azotanów i azotynów) [60]. Ponieważ u osób z nadciśnieniem sodoopornym brak jest zależności pomiędzy spożyciem sodu, wielkością ciś-

nienia tętniczego a wydalaniem metabolitów NO, nie można w prosty sposób wytłumaczyć spadku ciśnienia przy stosowaniu restrykcji sodu wzrostem uwalniania NO u osób sodowrażliwych — dlatego też przyjmuje się, że przyczyna sodowrażliwości jest złożona, ale częściowo determinowana przez brak zdolności do zwiększenia uwalniania lub utrzymania produkcji NO w odpowiedzi na obciążenie sodem. Niedobór NO w czasie diety bogatosodowej prowadzi do zmiany zależności ciśnienie – natriureza i wzrostu ciśnienia tętniczego.

Jak dotąd, nie wiązano nadciśnienia sodowrażliwego z działaniem OFR, niemniej u szczurów z tą postacią choroby, pozostających na diecie bogatosodowej, stwierdzono wzmożoną produkcję nadtlenu wodoru [41].

Wolne rodniki a układ renina-angiotensyna-aldosteron

Renina produkowana przez aparat przykłębuszkowy nerek i powstające w następstwie jej działania peptydy angiotensynowe i aldosteron biorą udział w regulacji ciśnienia tętniczego poprzez wpływ na napięcie naczyń i aktywację układu współczulnego oraz na gospodarkę sodową i objętość płynów ustrojowych.

Ostatnie badania dokumentują związek OFR ze wzmożoną aktywnością układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) w nadciśnieniu tętniczym. Wykazano, że aktywność enzymu konwertującego angiotensynę w naczyniach chorych z nadciśnieniem wzrasta w toku choroby [47]. Wzrasta również reakcja skurczowa naczyń w odpowiedzi na angiotensynę [47].

Usui i wsp. wykazali, że O_2^- aktywuje enzym przekształcający w ścianie naczynia [66], natomiast u podłoża stresu oksydacyjnego wywołanego przez angiotensynę II leży zwiększenie pod jej wpływem aktywności oksydazy NADH komórek śródbłónka i miocytów — źródła O_2^- w ścianie naczynia [1, 17, 19–21].

In vivo nawet po podaniu niewielkiej ilości angiotensyny, nie powodującej wzrostu ciśnienia, obserwowano dwukrotny wzrost aktywności oksydazy NADH uwalniającej O_2^- , co sugeruje, że to właśnie angiotensyna, a nie wzrost ciśnienia, jest stymulatorem produkcji OFR [1, 20].

Wzrostowi stężenia O_2^- w następstwie infuzji angiotensyny towarzyszy upośledzenie śródbłonkowo-zależnej wazorelaksacji, czego nie obserwuje się po podaniu noradrenaliny (NA) [18]. Blokada receptorów AT_1 powoduje zahamowanie oksydazy NADH i zmniejszenie produkcji O_2^- , z wyraźną poprawą funkcji rozkurczowej śródbłónka [17, 19, 21].

Za udziałem OFR w patogenezie nadciśnienia tętniczego przemawia fakt, że ostremu nadciśnieniu

wywołanemu u szczurów infuzją angiotensyny II towarzyszy uszkodzenie komórek śródbłónka i miocytów, któremu można zapobiec, stosując antyoksydanty [67]. Podanie takim zwierzętom SOD obniżyło ciśnienie o 50 [18] do 60 mm Hg [57], podczas gdy nie miała ona żadnego wpływu na wartość ciśnienia w grupie kontrolnej i otrzymującej NA [18].

Angiotensyna II stymuluje też ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę ET_1 . Zastosowanie antagonistów ET_1 zapobiega nadciśnieniu tętniczemu wywołanemu eksperymentalnie infuzją angiotensyny [1].

Wzmożona produkcja OFR prawdopodobnie jest też istotna dla hipertrofii miocytów wywołanej angiotensyną II. Pośredniczą one w aktywacji przez angiotensynę protoonkogenów c-fos i c-jun, prowadzących do proliferacji i hipertrofii miocytów [68]. Komórki, w których aktywność oksydazy NADH została zmniejszona, charakteryzowały się istotnie mniejszym wzrostem w odpowiedzi na angiotensynę [1].

Angiotensyna II poprzez wzmożoną produkcję OFR wpływa na wzrost napięcia naczyń, ich przebudowę, proliferację neointymy, zakrzepicę wewnątrznaczyniową i rozwój miażdżycy, co może wyjaśniać kliniczne obserwacje większej częstości powikłań sercowo-naczyniowych u osób z wysokimi stężeniami reniny i angiotensyny niż u pacjentów z niskim profilem reninowym. W świetle tych danych korzystne działanie inhibitorów ACE opiera się na hamowaniu powstawania angiotensyny II, która nie tylko kurczy naczynia, ale pobudzając aktywność oksydazy NADH w komórkach śródbłónka i miocytach stymuluje wytwarzanie O_2^- unieczynnającego NO, zwiększa syntezę endoteliny i stymuluje proliferację miocytów.

Endotelina a wolne rodniki tlenowe

Endotelina (ET_1) jest peptydem najsilniej obkurczającym naczynia krwionośne i choć jej stężenia w surowicy nie korelują z wartością ciśnienia tętniczego, to podejrzewa się jej udział w regulacji napięcia naczyń i patofizjologii nadciśnienia. Wytwarzana jest w różnych tkankach, ale ta syntetyzowana w komórkach śródbłónka pod wpływem adrenaliny, angiotensyny II, wazopresyny, trombiny, interelukiny 1 i niedotlenienia odgrywa najważniejszą rolę w patologii układu naczyniowego.

Endotelina powstaje na drodze enzymatycznej konwersji nieaktywnej pre-pro- ET_1 do tzw. dużej endoteliny (*big* ET_1), przekształcanej przez enzym konwertujący endotelinę do jej formy aktywnej. Już niskie, podprogowe stężenia endoteliny zwiększają skurczową reakcję naczyń na noradrenalinę i serotoninę [47]. Efektem pobudzenia śródbłonkowych receptorów ET_B

jest krótkotrwały rozkurcz naczyń, pobudzenie receptorów ET_A , a w niektórych obszarach naczyniowych również receptorów ET_B miocytów powoduje długotrwałe obkurczenie naczyń i wzrost ciśnienia, aktywację układu współczulnego, ekspresję kinazy białkowej C i stymulację proliferacji miocytów naczyniowych [69–71]. Infuzja endoteliny, zarówno u zwierząt doświadczalnych jak i u ludzi, wywołuje istotny i trwały wzrost ciśnienia [18, 72, 73], natomiast blokery receptorów ET_A i ET_B obniżają ciśnienie u szczurów i małp z nadciśnieniem tętniczym [74, 75].

Najnowsze badania *in vitro* wykazały, że stymulatorem wzrostu stężenia mRNA $ET1$ do 500% i 8-krotnego wzrostu aktywności pre-pro- $ET1$ są OFR powstające w wyniku działania oksydazy ksantynowej [76]. Obserwowany również w kłębuszkach nerkowych szczurów zdrowych i z cukrzycą wzrost stężenia $ET1$ pod wpływem tego enzymu można było istotnie zredukować, podając zwierzętom *in vivo* SOD lub Cat i potwierdzając udział OFR w powstawaniu $ET1$ [77].

Wolne rodniki tlenowe są najpewniej również mediatorami działania $ET1$. Za pośrednictwem receptorów ET_B stymuluje ona ekspresję podjednostki gp9 (phox) odpowiedzialnej za powstawanie $NAD(P)H$ -oksydazy w komórkach śródbłonna, przez co zwiększa produkcję O_2^- i w ten sposób przyczynia się do nasilenia stresu oksydacyjnego [78].

Inne badania mechanizmu działania $ET1$ dotyczą uszkodzeń poreperfuzyjnych, od dawna przypisywanych wolnym rodnikom tlenowym. W naczyniach towarzyszy im upośledzona relaksacja po podaniu Ach, której można całkowicie zapobiec, podając inhibitor białkowej kinazy C lub nieselektywny bloker receptorów $ET1$ (bosentan), a częściowo zapobiec działaniem inhibitora enzymu przekształcającego endotelinę (fosforamidon) lub SOD [79]. Sugerowana przez autorów sekwencja następstw reperfuzyj to: aktywacja za pośrednictwem $ET1$ kinazy białkowej C, zwiększona generacja O_2^- i jego toksycznych metabolitów oraz uszkodzenie i dysfunkcja śródbłonna [79].

Istnieją również endogenne mechanizmy chroniące układ naczyniowy przed nadmiarem OFR, a jednym z nich jest hamujący wpływ O_2^- na enzym konwertujący endotelinę, powodujący zmniejszenie jej syntezy [80].

Wolne rodniki tlenowe jako mediatory działania kinin

Rola bradykininy w patofizjologii nadciśnienia tętniczego nie jest dokładnie określona, prawdopodobnie najważniejszą rolę pełni bradykinina powstająca

w tkankach, szczególnie w nerkach. W warunkach fizjologicznych, działając para- i autokrynnie, powoduje wzrost uwalniania NO i rozkurcz naczyń, hamując transport sodu i wody w kanalikach zbiorczych, zwiększa natriurezę i diurezę, a aktywując fosfolipazę A_2 , zwiększa syntezę prostaglandyn nerkowych.

W warunkach patologii związanej z dysfunkcją śródbłonna, bradykinina może być stymulatorem proliferacji mięśni gładkich naczyń. Jak wykazały badania Green i wsp., wtórnym przekaźnikiem w tym procesie są OFR, wytwarzane głównie przez oksydazę NADH miocytów na drodze pobudzenia kininowych receptorów B_2 [81]. Wolne rodniki tlenowe aktywują kinazę białkową C, są stymulatorem szlaku kinaz MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) — p 42^{mapk} i p 44^{mapk} oraz stymulują ekspresję protoonkogenów c-fos i c-jun. W badaniach Green i wsp. komórki mięśni gładkich aorty pod wpływem bradykininy wytwarzały 3-krotnie więcej OFR niż komórki kontrolne, a wzrost ten hamowało działanie związku blokującego receptory B_2 [81]. Bradykinina powodowała 5–6-krotny wzrost fosforylacji MAPK, indukcję c-fos mRNA mierzoną wzrostem jego stężenia oraz efekt mitogenowy wyrażający się wzrostem syntezy DNA w komórkach mięśni gładkich. Powyższe działania bradykininy blokowano lub istotnie zredukowano (25–80%) poprzez zastosowanie różnych przeciwutleniaczy. Uzyskane przez Green i wsp. wyniki sugerują, że poza fizjologicznym działaniem bradykininy, którego mediatorem jest NO, może ona uczestniczyć w patogenezie zmian naczyniowych towarzyszących nadciśnieniu, a mediatorami jej działania są wolne rodniki tlenowe [81].

Rola wolnych rodników w przebudowie naczyń

Przebudowa ściany naczyń polegająca na rozroście błony wewnętrznej i przydanki jest wyrazem adaptacji ściany naczyniowej do przeciążenia wynikającego z podwyższonego ciśnienia tętniczego. Elementami przebudowy są: reakcja zapalno-immunologiczna, migracja i proliferacja miocytów i fibroblastów, zwiększona produkcja białek podścieliska oraz nasilona apoptoza.

Mediatorami przebudowy naczyń są wolne rodniki tlenowe. Nadtlenek wodoru stymuluje wzrost miocytów ściany naczyniowej oraz jest mediatorem proliferacji i hipertrofii wywoływanej przez czynniki wzrostu [1]. Pod wpływem jego działania stwierdzono zwiększoną ekspresję (*upregulation*) genów odpowiedzialnych za syntezę czynników wzrostowych w komórkach śródbłonna naczyniowego [82]. Po przez zdolność do gwałtownego nasilenia fosforylacji

tyrozyny w wielu białkach komórkowych nadtlenek wodoru naśladuje metaboliczne i troficzne działanie insuliny [83]. Działa jako przekaźnik sygnałów w procesie przyłączenia płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) do miocytów ściany naczyniowej z następującą fosforylacją tyrozyny, chemotaksją i syntezą DNA [84]. Stymulatorem proliferacji komórek ściany naczyniowej jest też rodnik ponadtlenkowy. Obie te reaktywne formy tlenu wywołują apoptozę.

Wolne rodniki tlenowe, jak opisano wcześniej, są mediatorami stymulującego proliferację działania angiotensyny, a w pewnych sytuacjach również bradykininy.

Efektem działania OFR jest też wzrost wytwarzania białek adhezyjnych i czynników chemotaktycznych zatrzymujących przepływające monocyty i leukocyty, które osiedlając się w ścianie naczyniowej stają się zaczątkiem zmian miażdżycowych [1, 32, 47].

W procesie przebudowy naczyń istotne zmiany dotyczą również macierzy pozakomórkowej. Nadtlenek wodoru i nadtlenoazotyn (ONOO⁻) uaktywniają metaloproteinazy MMP-2 i MMP-4 biorące udział w degradacji błon podstawnych i elastyny [1].

Czy istnieje związek pomiędzy aktywnością układu współczulnego a działaniem wolnych rodników tlenowych?

Nadciśnienie tętnicze pierwotne związane jest ze wzrostem aktywności układu współczulnego. Efektem jego pobudzenia jest wzrost aktywności katecholamin, układu RAA, skurcz naczyń, podwyższenie stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu, hiperinsulinemia, wzrost aktywności płytek, co przyczynia się zarówno do zwiększenia napięcia i skurczu, jak i do przebudowy ściany naczyniowej oraz rozwoju zmian miażdżycowych.

Zachodzący *in vivo* proces utleniania katecholamin (poprzez wytworzenie o-chinonów: aminochromu, dopachromu, adrenochromu i noradrenochromu, ich redukcję do semichinonów, a następnie utlenienie, w toku którego uwalnia się O₂⁻) jest uznanym źródłem wolnych rodników tlenowych [2]. Choć logiczny wydawałby się pogląd, że zwiększone w nadciśnieniu tętniczym stężenie katecholamin powinno sprzyjać zwiększonej ilości OFR, to eksperymenty z wywołanym infuzją NA nadciśnieniem u szczurów nie wykazały zwiększonej ilości O₂⁻ (przynajmniej w dużych naczyniach przewodzących) ani korzystnego wpływu SOD — pod jej wpływem nie obserwowano ani spadku ciśnienia, ani poprawy rozkurczu naczyń w odpowiedzi na Ach. Z kolei udowodniono kardiotoksyczny wpływ podwyższonego stężenia katecholamin w postaci rozwoju wywołanej nimi kar-

diomiopatii, w którym to procesie mediatorami są wolne rodniki tlenowe [2]. Z tego względu ocena zależności między podwyższoną aktywnością układu sympatycznego w nadciśnieniu tętniczym a działaniem OFR wymaga dalszych badań.

Wolne rodniki a kurczliwość błony mięśniowej naczyń

Wolne rodniki zwiększają napięcie naczyń niezależnie od zmian uwalniania NO. Mechanizmem prowadzącym do większej kurczliwości miocytów jest wzrost zawartości jonów wapnia w sarkoplazmie w następstwie [2]:

— zwiększonego napływu Ca²⁺ do komórki pod wpływem O₂⁻ i H₂O₂;

— zmniejszenia aktywności Ca-zależnej ATP-azy siateczki endoplazmatycznej pod wpływem O₂⁻ i OH⁻;

— zwiększonego uwalniania Ca²⁺ z siateczki endoplazmatycznej pod wpływem O₂⁻, OH⁻ i NO.

W wyniku reakcji OFR z kwasami tłuszczowymi błon dochodzi do wzrostu napięcia naczyń wywołanego przez isoprostanoidy reagujące z receptorami PGH₂/TXA₂ [1].

Podsumowując, OFR są ogniwem w wielu mechanizmach składających się na patogenezę nadciśnienia tętniczego. Przyczyniają się do zmniejszenia biodostępności NO i zaburzenia równowagi między czynnikami rozszerzającymi naczynia, działającymi antyagregacyjnie, antyproliferacyjnie i antyadhezyjnie a substancjami o działaniu przeciwnym. Wolne rodniki tlenowe są mediatorami działania angiotensyny II, bradykininy i innych czynników wzrostowych stymulujących proliferację mięśni gładkich i przebudowę ściany naczyniowej, bezpośrednio uszkadzają komórki śródbłonna, przyczyniają się do wzrostu zawartości jonów wapnia w miocytach, co sprzyja zwiększonej kurczliwości, a przy nadmiernym obciążeniu prowadzi do degeneracji i śmierci komórki. Nie można wykluczyć udziału OFR w mechanizmie sodowrażliwości nadciśnienia oraz nasileniu działania katecholamin.

W tabeli I zestawiono te działania OFR, które mogą mieć znaczenie w patogenezie nadciśnienia tętniczego.

Powyższe dowody dokumentują nie tylko współistnienie, ale i powiązania między stresem oksydacyjnym a nadciśnieniem tętniczym, natomiast bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy OFR są czynnikiem sprawczym nadciśnienia, czy też stres oksydacyjny rozwijający się w przebiegu choroby sprzyja podtrzymaniu podwyższonego ciśnienia i rozwojowi powikłań narządowych.

Tabela I. Udział wolnych rodników tlenowych (OFR) w mechanizmach patogenetycznych nadciśnienia tętniczego
Table I. Oxygen free radicals in pathogenesis of hypertension

Mechanizm patogenetyczny nadciśnienia tętniczego	Udział wolnych rodników tlenowych
Zmniejszenie biodostępności NO i dysfunkcja śródbłónka	1. Reakcja NO z O ₂ 2. Uszkodzenie komórek śródbłónka
Wzmoczona aktywność układu RAA	1. O ₂ ⁻ aktywuje enzym przekształcający 2. Angiotensyna II stymuluje produkcję O ₂ ⁻ przez NADH oksydazę 3. Indukcja c-fos i c-jun przez OFR
Wzmoczona aktywność układu współczulnego	Brak danych
Bradykinina	O ₂ ⁻ mediatorem działania proliferacyjnego
Endotelina i inne czynniki wazokonstrykcyjne	1. OFR zwiększają syntezę ET1 2. ET1 wzmacnia produkcję O ₂ ⁻ przez NAD(P)H oksydazę 3. OFR mediatorami działania ET1 4. OFR zwiększają produkcję TXA ₂
Zwiększenie kurczliwości i reaktywności naczyń	1. OFR zwiększają stężenie Ca ²⁺ w miocytach
Przebudowa naczyń	1. Zwiększają ekspresję genów czynników wzrostowych 2. Aktywują protoonkogeny 3. Są wtórnymi przekaznikami w procesach proliferacji
Mechanizm sodowrażliwości	Pojedyncze doniesienie

Jedną z przesłanek przemawiających za udziałem OFR w patogenezie nadciśnienia tętniczego jest hipotensyjne działanie przeciwutleniaczy. W pionierskiej w tej dziedzinie pracy Nakazono i wsp., podając szczurom dysmutazę ponadtlenkową wykazującą powinowactwo do siarczanu heparanu i lokalizującą się w ścianie naczyniowej (HB-SOD), uzyskali obniżenie ciśnienia tętniczego o 50 mm Hg u szczurów z nadciśnieniem, natomiast nie miała ona wpływu na ciśnienie osobników kontrolnych [57]. Stosując różne postaci SOD, wyniki Nakazono i wsp. potwierdzili inni autorzy, wykazując również spadek pod wpływem SOD produkcji OFR i poprawę funkcji rozkurczowej śródbłónka [13, 18, 37, 54–56].

Spadek ciśnienia obserwowano po podaniu szczurom SHR oxypurinolu — inhibitora oksydazy ksantynowej wytwarzającej O₂⁻ oraz w wyniku działania SOD u szczurów z nadciśnieniem wywołanym angiotensyną, co również wskazuje na udział stresu oksydacyjnego w wywoływaniu nadciśnienia [18, 57].

Kolejnym antyoksydantem, który przywraca rozkurczową funkcję śródbłónka przez odbudowanie zasobów NO, jest witamina C [37].

U pacjentów z zespołem Downa związanym z trisomią chromosomu 21, na którym zlokalizowany jest gen dla cytoplazmatycznej SOD, posiadających o oko-

ło 50% wyższą aktywność enzymu, występują niższe wartości ciśnienia i nie obserwuje się u nich typowego wzrostu ciśnienia tętniczego wraz z wiekiem [85, 86].

Wspomniane już prooksydacyjne działanie angiotensyny w stężeniach niepowodujących wzrostu ciśnienia także sugeruje, że stres oksydacyjny może być zjawiskiem pierwotnym w stosunku do nadciśnienia [1, 20].

Istotna dla tych rozważań jest obserwacja, że upośledzenie śródbłonkowo-zależnej wazorelaksacji stwierdza się już u zdrowego (z prawidłowym ciśnieniem tętniczym) potomstwa rodziców chorych na nadciśnienie tętnicze, a więc jest ono związane, przynajmniej w części, z predyspozycją genetyczną, a nie jest tylko konsekwencją podwyższonego ciśnienia [87, 88].

Lacy i wsp., badając stężenia H₂O₂ w osoczu osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia i osób z nadciśnieniem tętniczym wykazali, że osoby bez nadciśnienia tętniczego, u których w wywiadzie stwierdzono rodzinną predyspozycję do choroby, charakteryzują się o około 32% wyższym stężeniem nadtlenku wodoru w osoczu w porównaniu z osobami bez nadciśnienia i bez obciążenia rodzinnego [9]. Badania te ujawniły obecność liniowej korelacji między wartością średniego BP a stężeniami H₂O₂

w osoczu. Podobną korelację między wartościami SBP i DBP a stężeniami OFR uwalnianymi przez neutrofile wykazał Sagar i wsp. [11], choć nie wszystkie badania potwierdzają taką zależność [16].

Zastosowana przez Lacy i wsp. analiza wariancji ujawniła, że spośród dwóch czynników wpływających na stężenie H_2O_2 w osoczu — wartości ciśnienia i rodzinnego obciążenia nadciśnieniem, ten drugi jest bardziej istotny ($p = 0,003$ vs $p = 0,093$) [9]. Obserwacje te sugerują, że zwiększona produkcja OFR może być wczesnym zjawiskiem w patogenezie nadciśnienia tętniczego, wyprzedzającym wzrost ciśnienia.

Choć, jak przedstawiono, bardzo liczne badania dokumentują udział OFR w nadciśnieniu tętniczym, to nadal nie rozstrzygnięto problemu, czy to właśnie one odpowiadają za rozwój nadciśnienia. Przy obecnym stanie wiedzy ich działanie, mające związek z upośledzoną funkcją rozkurczową śródbłonna, wiąże się raczej z rozwojem powikłań narządowych nadciśnienia, poszukując dalej mechanizmów sprawczych choroby, zwłaszcza że najnowsze badania ujawniają rolę stresu oksydacyjnego jako stymulatora rozkurczu śródbłonna przez pobudzenie wydzielania czynnika natriuretycznego typu C i adrenomeduliny przez H_2O_2 [89], a także wspomnianego już hamowania przez rodnik ponadtlenkowy enzymu konwertującego endotelinę [80]. W świetle przedstawionych wyników wydaje się, że w warunkach fizjologii OFR pełnią funkcje modulujące napięcie naczyniowe, w warunkach patologii z nieskompensovanym nadmiernym wytwarzaniem OFR przeważa ich działanie zwiększające tonus naczyniowy i ciśnienie tętnicze.

Odkrywanie i poznawanie mediatorów szlaków patogenetycznych nadciśnienia tętniczego rozszerza wiedzę o mechanizmach działania leków hipotensyjnych i możliwościach prewencji powikłań sercowo-naczyniowych za pośrednictwem inhibitorów ACE, leków blokujących receptory angiotensyny lub endoteliny, leków hipolipemizujących i przeciwutleniaczy.

Streszczenie

Stres oksydacyjny będący brakiem równowagi między czynnikami pro- i antyoksydacyjnymi, powodujący liczne uszkodzenia i zmiany na poziomie subkomórkowym, może być przyczyną procesu starzenia oraz wielu stanów patologicznych i chorób. Celem dokonanego przeglądu piśmiennictwa było przedstawienie poznanych do tej pory przesłanek wskazujących na udział wolnych rodników tlenowych w patogenezie nadciśnienia tętniczego.

Źródłem wolnych rodników w układzie naczyniowym mogą być enzymy komórek śródbłonna, miocytów, makrofagów, neutrofilów: oksydazy NADH/ $NAD(P)H$, oksydaza ksantynowa, syntaza tlenu azotu, cyklooksygenazy.

Skutkiem działania wolnych rodników jest uszkodzenie błon komórkowych i organelli, inaktywacja enzymów, przeciążenie komórek jonami wapnia, uszkodzenie genomu, niedobory energetyczne. W wyniku reakcji rodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu dochodzi do jego unieczynnienia i zmniejszenia jego biodostępności, co leży u podłoża zaburzenia czynności śródbłonna. Wobec niedoboru tlenu azotu przewagę zyskują czynniki naczyniozwiększające, jak angiotensyna, endotelina, prostaglandyna H_2 , i tromboksan A_2 , jego niedobór sprzyja też ujawnieniu sodowrażliwości związanej z zaburzeniem natriurezy. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wykazały, że wolne rodniki są mediatorami działania angiotensyny II, najpewniej również endoteliny i bradykininy. Są mediatorami działania czynników wzrostowych, aktywują protoonkogeny c-fos i c-jun, biorą udział w przebudowie ściany naczyniowej.

Wyniki wielu badań wykazywały zależność między aktywnością enzymów uwalniających wolne rodniki lub stężeniem wolnych rodników a wartością ciśnienia tętniczego.

Udział wolnych rodników w stymulowaniu reakcji skurczowej i przebudowie naczyń potwierdza możliwość blokowania i zapobiegania tym zmianom oraz obniżenia ciśnienia tętniczego przez zastosowanie przeciwutleniaczy.

Choć dotychczasowe badania nie pozwalają na wysunięcie hipotezy o roli przyczynowej wolnych rodników w wywoływaniu nadciśnienia tętniczego, to dokumentują ich udział w rozwoju powikłań naczyniowych.

słowa kluczowe: nadciśnienie tętnicze, wolne rodniki tlenowe, tlenek azotu, angiotensyna II, endotelina

Nadciśnienie Tętnicze 2001, tom 5, nr 2, strony 147–158.

Piśmiennictwo

1. Harrison D.G., Galis Z., Parthasarathy S., Griendling K.: Oxidative Stress and Hypertension. W: Izzo J.L., Black H.R. [red.] Hypertension Primer. The Essentials of High Blood Pressure. Lippincott Williams & Wilkinson, Baltimore 1999, 163–166.
2. Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T.: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J. Hypertens. 2000, 18, 655–673.
3. Skalska A.: Aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia: seleny, miedzi, cynku i żelaza w erytrocytach oraz w osoczu ludzi w wieku podeszłym. Rozprawa doktorska. Collegium Medicum UJ, Kraków, 1997.
4. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F.Jr.: Antioxidants and atherosclerotic heart disease. N. Engl. J. Med. 1997, 337, 408–416.

5. Kałużny J.J., Kałużny J.: Współczesne poglądy na patogenezę i możliwości profilaktyki zaćmy starczej. *Pol. Merkuriusz Lek.* 1997, II (7), 76–77.
6. Kehrer J.P.: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993, 23, 21–48.
7. Bertrand E., Lechowicz W., Szpak G.M., Dymecki J.: Obecne poglądy na mechanizm śmierci neuronów dopaminergicznych układu nigrostriatalnego w chorobie Parkinsona. *Neur. Neurochir. Pol.* 1997, 31, 295–300–1146.
8. Pitchumoni S.S., Doraiswamy P.M.: Current Status of Antioxidant Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1998, 46, 1566–1572.
9. Lacy F., O'Connor D.T., Schmid-Schönbein G.W.: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subject at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* 1998, 16, 291–303.
10. Kumar K.V., Das U.N.: Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension. *Free Radic. Res. Commun.* 1993, 19, 59–66.
11. Sagar S., Kallo I.J., Kaul N., Ganguly N.K., Sharma B.K.: Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem.* 1992, 111, 103–108.
12. Prabha P.S., Das U.N., Koratka R., Sagar P.S., Ramesh G.: Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1990, 41, 27–33.
13. Brovkovich V., Dobrucki L.W., Brovkovich S., Dobrucki I., Do Nascimento C.A., Burewicz A., Maliński T.: Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J. Physiol. Pharmacol.* 1999, 50, 575–586.
14. Mehta J.L., Lopez L.M., Chen L., Cox O.E.: Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. *Am. J. Cardiol.* 1994, 74, 901–905.
15. Tse W.Y., Maxwell S.R., Thomason H., Blann A., Thorpe G.H., Waite M., Holder R.: Antioxidant status in controlled and uncontrolled hypertension and its relationship to endothelial damage. *J. Hum. Hypertens.* 1994, 8, 843–849.
16. Kristal B., Shurtz-Swirski R., Chezar J., Manaster J., Levy R., Shapiro G. i wsp.: Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1998, 11, 921–928.
17. Berry C., Hamilton C.A., Brosnan J., Magill F.G., Berg G.A., McMurray J.J.V. i wsp.: Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels. Angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000, 101, 2206–2212.
18. Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z., Tarpey M., Freeman B.A., Harrison D.G.: Role of superoxide in Angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997, 95, 588–593.
19. Warnholtz A., Nickenig G., Schultz E., Macharzina R., Bräsen J.H., Skatchkow M. i wsp.: Increased NADH-Oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. Evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999, 99, 2027–2033.
20. Rajagopalan S., Kurz S., Münzel T., Tarpey M., Freeman B.A., Griendling K.K., Harrison D.G.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J. Clin. Invest.* 1996, 97, 1916–1923.
21. Zhang H., Schmeiber A., Garlich Ch.D., Plötze K., Damm U., Mügge A., Daniel W.G.: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc. Res.* 1999, 44, 215–222.
22. Hishikawa K., Oemar B.S., Yang Z., Lüscher T.F.: Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ. Res.* 1997, 81, 797–803.
23. Gillum R.F., Mussolino M.E.: White blood cell count and hypertension incidence. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *J. Clin. Epidemiol.* 1994, 47, 911–919.
24. Friedman G.D., Selby J.V., Quesenberry C.J.: The leukocyte count: a predictor of hypertension. *J. Clin. Epidemiol.* 1990, 43, 907–911.
25. Newaz M.A., Adeeb N.N., Muslim N., Razak T.A., Htut N.N.: Uric acid, xanthine oxidase and other risk factors of hypertension in normotensive subject. *Clin. Exp. Hypertens.* 1996, 18, 1035–1050.
26. Selby J.V., Friedman G.D., Quesenberry C.P.J.: Precursors of essential hypertension: pulmonary function, heart rate, uric acid, serum cholesterol, and other serum chemistries. *Am. J. Epidemiol.* 1990, 131, 1017–1027.
27. John S., Schmieder R.E.: Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanism and differences. *J. Hypertens.* 2000, 18, 363–374.
28. Ohara Y., Peterson T.E., Harrison G.D.: Hypercholesterolemia. Increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 1993, 91, 2546–2551.
29. Pritchard K.A., Groszek L., Smalley D.M., Sessa W.C., Wu M., Villalon P. i wsp.: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ. Res.* 1995, 77, 510–518.
30. Wever R.M.F., van Dam T., van Rijn H.J., de Groot F., Rabelink T.J.: Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 237, 340–344.
31. Cosentino F., Katusic Z.: Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995, 91, 139–144.
32. Li H., Förstermann U.: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000, 190, 244–254.
33. Ting H.H., Timimi F.K., Haley E.A., Roddy M.A., Ganz P., Creager M.A.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997, 95, 2617–2622.
34. Taddei S., Virdis A., Mattei P., Salvetti A.: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Circulation* 1993, 21, 929–933.
35. Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L., Maganga A., Salvetti A.: Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 1997, 29, 2274–2279.
36. Panza J.A., Casino P.R., Badar B.M., Ouyyumi A.A.: Effects of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 1993, 87, 1475–1481.
37. Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L., Maganga A., Salvetti A.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998, 97, 2222–2229.
38. Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M.: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323, 27–36.

39. Suzuki H., Swei A., Zweifach B.W., Schmid-Schönbein G.W.: In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hydroethidine microfluorography*. *Hypertension* 1995, 25, 1083–1089.
40. Wolin M.S.: Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. *Klin. Wochenschr.* 1991, 69, 1046–1049.
41. Swei A., Lacy F., DeLano F.A., Schmid-Schönbein G.W.: Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 1997, 30, 1628–1633.
42. Harrison D.G.: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2153–2157.
43. Panza J.A., Casino P.R., Kilkoyne C.M., Quyyumi A.A.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993, 87, 1468–1474.
44. Node K., Kitakaze M., Yoshikawa H., Kosaka M., Hori M.: Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1997, 30, 405–408.
45. Miyazaki H., Matsuoka H., Cooke J.P. i wsp.: Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999, 99, 1141–1146.
46. Pryor W.A., Squadrito G.L.: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide and superoxide. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, L699–L722.
47. Lüscher T.F.: The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J. Hypertens.* 1994, 12 (supl. 10), 105–116.
48. Richard V., Tanner F.C., Tschudi M., Lüscher T.F.: Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin and clonidine in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 1990, 259, H1433–H1439.
49. Tschudi M., Richard V., Bühler F.R., Lüscher T.F.: Importance of endothelium-derived nitric oxide in intramyocardial porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 1990, 260, H13–H20.
50. Aisaka K., Gross S.S., Griffith O.W., Levi R.: N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 160, 881–886.
51. Rees D.D., Palmer R.M., Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 3375–3378.
52. Tresham J.J., Dusting G.J., Coghlan J.P., Whitworth J.A.: Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis in sheep. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1991, 18, 327–330.
53. Arnal J.F., Warin L., Michel J.P.: Determination of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 647–652.
54. Mügge A., Helwell J.H., Peterson T.E., Hofmeyer T.G., Heistad D.D., Harrison D.G.: Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 1991, 89, 1293–1300.
55. Garcia C.E., Kilkoyne C.M., Cardillo C., Cannon III R.O., Quyyumi A.A., Panza J.A.: Effect of Copper-zinc superoxide dismutase on endothelium-dependent vasodilation of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1995, 26, 863–868.
56. Solzbach U., Hornig B., Jeserich M., Just H.: Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997, 96, 1513–1519.
57. Nakazono K., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Sato T., Inoue M.: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 10045–10048.
58. Spieker L.E., Noll G., Ruschitzka F.T., Maier W., Lüscher T.F.: Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 2000, 14, 617–630.
59. Hibino M., Okumura K., Iwama Y., Mokuno S., Osanai H., Matsui H. i wsp.: Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A₂ in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999, 33, 605–610.
60. Cubeddu L.X., Alfieri A.B., Hoffmann I.S., Jimenez E., Roa C.M., Cubeddu R. i wsp.: Nitric Oxide and Salt Sensitivity. *Am. J. Hypertens.* 2000, 13, 973–979.
61. Chen P.Y., Sanders P.W.: L-arginine abrogates salt sensitivity hypertension in Dahl-Rapp rats. *J. Clin. Invest.* 1991, 88, 1559–1567.
62. Chen P.Y., Gladish R.D., Sanders P.W.: Vascular smooth muscle nitric oxide synthase anomalies in Dahl/Rapp salt sensitive rats. *Hypertension* 1998, 31, 918–924.
63. Tolins J.P., Shultz P.J.: Endogenous nitric oxide determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney* 1994, 46, 230–236.
64. Hu L., Manning R.D. Jr.: Role of nitric oxide in regulation of long-term pressure-natriuresis relationship in Dahl rats. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, H2375–H2383.
65. Fujiwara K., Hayashi K., Matsuda H., Kubota E., Hon M., Ozawa Y., Saruta T.: Altered pressure-natriuresis in obese Zucker rats. *Hypertension* 1999, 33, 1470–1475.
66. Usui M., Egashira K., Tomita H., Katoh M.: Superoxide is involved in the activation of vascular angiotensin-converting enzyme in rats induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* 1997, 96 (supl. I), I-489 (streszczenie).
67. Wilson S.K.: Role of oxygen-derived free radicals in acute angiotensin induced hypertensive vascular disease in the rat. *Circ. Res.* 1990, 66, 722–734.
68. Oskarsson H.J., Heistad D.D.: Oxidative Stress Produced by Angiotensin Too. Implications for Hypertension and Vascular Injury. *Circulation* 1997, 95, 557–559.
69. Ihara M., Noguchi K., Saeiki T., Fukuroda T., Tsuchida S., Kimura S. i wsp.: Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the AT_A receptor. *Life Sci.* 1992, 50, 247–255.
70. Wenzel R.R., Noll G., Lüscher T.F.: Endothelin receptor antagonists inhibit endothelin in human skin microcirculation. *Hypertension* 1994, 23, 581–586.
71. Seo B.G., Oemar B.S., Siebenmann R., Segesser L. von, Lüscher T.F.: Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin 1 in human blood vessels. *Circulation* 1994, 89, 1203–1208.
72. Lüscher T.F., Boulanger C.M., Dohi Y., Yang Z.: Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992, 19, 117–130.
73. Kiowski W., Lüscher T.F., Linder L., Bühler F.R.: Endothelin-1-induced vasoconstriction in man: reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 1991, 83, 469–475.
74. Nishikibe M., Ikada M., Tsuchida S., Fukuroda T., Shimamoto K., Kobayashi M. i wsp.: Antihypertensive effect of a newly synthesized endothelin antagonist, BQ 123, in genetic hypertension models. *J. Hypertens.* 1992, 10 (supl. 4), S50 (streszczenie P53).
75. Clozel M., Breu V., Burri K., Cassal J.M., Fischli W., Gray G.A. i wsp.: Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993, 365, 759–761.
76. Kahler J., Mendel S., Weckmüller J., Orzechowski H.D., Mittmann C., Koster R. i wsp.: Oxidative stress increases syn-

thesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2000, 32, 1429–437.

77. Chen H.C., Guh J.Y., Shin S.J., Tsai J.H., Lai Y.H.: Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 2000, 135, 309–315.

78. Duerrschmidt N., Wippich N., Goetsch W., Broemme H.J., Morawietz H.: Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 269, 713–717.

79. Maczewski M., Beręsewicz A.: The role of endothelin, protein kinase C and free radicals in the mechanism of the post-ischemic endothelial dysfunction in guinea-pig hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2000, 32, 297–310.

80. Lopez-Ongil S., Senchak V., Saura M., Zaragoza C., Ames M., Ballermann B i wsp.: Superoxide regulation of endothelin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 26423–26427.

81. Green E.L., Velarde V., Jaffa A.: Role of reactive oxygen species in bradykinin-Induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* 2000, 35, 942–947.

82. Chua C.C., Hamdy R.C., Chua B.H.: Upregulation of vascular endothelial growth factor by H_2O_2 in rat heart endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 1998, 25, 891–897.

83. Heffetz D., Bushkin I., Dror R., Zick Y.: The insulinomimetic agents H_2O_2 and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 2896–2902.

84. Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T.: Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995, 270, 296–299.

85. De La Torre R., Casado A., Lopez-Fernandez E., Carrascosa D., Ramirez V., Saez J.: Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21, *Experientia* 1996, 52, 871–873.

86. Morrison R.A., Mc Grath A., Davidson G., Brown J.J., Murray G.D., Lever A.F.: Low blood pressure in Down's syndrome. A link with Alzheimer's disease? *Hypertension* 1996, 28, 569–575.

87. Taddei S., Salvetti A., Viridis A., Mattei P., Arzilli F.: Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subject with familial history of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992, (supl. 12), S193–S195.

88. Taddei S., Viridis A., Mattei P., Ghadoni L., Sudano I., Salvetti A.: Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 1996, 6, 1298–1303.

89. Chun T-H., Itoh H., Saito T., Yamahara K., Doi K., Mori Y. i wsp.: Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *J. Hypertens.* 2000, 18, 575–580.